

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880034

研究課題名(和文)次世代シーケンサーで迫るナガキクイムシの共生微生物生態

研究課題名(英文)Research on the ecology of symbiotic microbes of platypodid beetles disclosed by next-generation sequencing technology

研究代表者

遠藤 力也(Endo, Rikiya)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・協力研究員

研究者番号：90634494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：ナラ枯れの媒介者である“太平洋型”のナガキクイムシ(以下、“太平洋型”)について、坑道(巣)壁における微生物群集構造を明らかにした。“太平洋型”を穿孔させたコナラ丸太を割材し、穿孔虫の蛹室2検体と水平坑道4検体の坑道片を切り出した。これらを希釈平板法(培養法)による菌類群集の解析、および次世代シーケンサーを用いた全微生物群集の解析(非培養法)に供試した。希釈平板法によって、“太平洋型”の菌類群集はカシノナガキクイムシのものと酷似したものであることが判った。また非培養法によって、供試した6検体全てからActinomyces sp.が検出され、“太平洋型”の共生者である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：I disclosed the whole microbiome on the beetle galleries of a platypodid beetle ('pacific type') that vectors oak wilt disease. Bait logs of Quercus serrata that attacked by 'pacific type' were collected and broken into small pieces including pupal chamber (n=2) or lateral gallery (n=4). Microbiome on the beetle galleries was analysed by culture dependent and/or non-dependent methods. Population analysis by dilution plate technique (culture dependent) revealed that fungal population on the galleries of 'pacific type' was quite similar to that of Platypus quercivorus, a vector of Japanese Oak Wilt. Also, Actinomyces sp. was detected from all 6 samples tested by the microbiome analysis using a next generation sequencer (culture non-dependent), indicating that it is likely an important symbiont of 'pacific type'.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学、森林科学

 キーワード：ナラ枯れ カシノナガキクイムシ 養菌性クイムシ 次世代シーケンサー 酵母生態 メタゲノム
太平洋型

1. 研究開始当初の背景

日本全国の森林でナラ枯れ(ブナ科樹木萎凋病)の拡大が問題となっている。ナラ枯れは、カシノナガキクイムシ(*Platypus quercivorus*, 以下、カシナガ)が媒介者として植物病原糸状菌 *Raffaelea quercivora* (いわゆる“ナラ菌”)を宿主樹木内へ伝搬することに因る劇症型樹木病害であり(小林・上田 2005, 日林誌 87: 435-450)、カシナガは日本における最重要森林害虫の1つであるといえる。一方、カシナガは自らの食餌源を共生酵母類に依存しており、多種の微生物と複合共生系にある特異な生態をもつ。

2010年には群馬県みなかみ町でもナラ枯れ被害が確認され(群馬県ホームページ)、ついには関東平野への拡大が危惧されるに至った。また、三重県から和歌山県の太平洋沿岸でもナラ枯れが近年急速に拡大しており、紀伊備長炭生産の原木となるウバメガシの被害が問題となっている。

紀伊半島でナラ枯れのベクターとなっているナガキクイムシ(以下、“太平洋型”)は、本州日本海側のナラ枯れのベクターであるもの(以下、“日本海型”)とは分子系統学的にかけ離れていることが報告されている(Hamaguchi & Goto 2010, Appl. Entomol. Zool. 45: 319-328)。

“日本海型”の共生菌類群集については以前に解明・報告した(Endoh et al. 2011, Microb. Ecol. 62: 106-120)。しかし“太平洋型”の共生菌類については未解明であった。また“日本海型”・“太平洋型”ともに、共生バクテリアに関する知見は全く無かった。

2. 研究の目的

ナラ枯れの媒介者であるカシナガ(“日本海型”・“太平洋型”)が樹木内で大増殖するメカニズムを、共生微生物との関係を端緒として解明する。すなわち、「虫の餌資源と考えられる共生菌類は、巢内でどのようにして安定的に供給され得るのか?」という問いに対し、「巢内の共生菌類群集の成立には、バクテリア群集が関与している」という仮説を立て、これを検証するための基礎的知見を蓄積することを目的とする。

特に、共生微生物に関して知見が非常に乏しい“太平洋型”に注目し、菌類(真核微生物)・バクテリア(原核微生物)双方の共生者の解明を目指す。

3. 研究の方法

和歌山県林業試験場(和歌山県上富田町)の栗生主任研究員の協力のもと、和歌山県白浜市内の山林に囲木としてコナラ丸太を設置した。ナガキクイムシが穿孔した後、丸太を割材した。穿孔虫の種を確認するため、丸太内で繁殖していたナガキクイムシの成虫2頭と幼虫4頭を無作為に選択し、以下に示す(1)の実験を行った。また、蛹室(n=2)および水平坑道(n=4)から坑道片を切り出し

た。蛹室および水平坑道は虫がよく繁殖に成功しているものを選択した。以上の坑道片を用いて以下の(2)~(4)の実験を行った。(1)虫体からDNAを抽出し、cytochrome oxidase 遺伝子の塩基配列を決定し、“日本海型”のものとの比較を行った。

(2)培養を介する方法により“太平洋型”巢壁の菌類群集構造の解析を行った。詳細は、既報の Endoh et al. (2011)を一部改編して実施した。これにより、共生する菌類株の確立・保存を試みた。

(3)(2)で確立した菌株と、既報の Endoh et al. (2011)で確立した菌株を用いて、坑道壁における優占菌種の同種性を確かめるため、生理生化学性状試験を行った。

(4)次世代シーケンサー Roche 454 sequencing GS Junior を用いたメタゲノム解析により“太平洋型”巢壁の微生物群集構造の解析を行った。メタゲノム解析は、真核微生物・原核微生物の両方を解析対象とした。真核微生物については Large subunit (26S) ribosomal RNA 遺伝子 D2 領域(約 300bp)を、原核微生物については Small subunit (16S) ribosomal RNA 遺伝子 V1 領域(約 300bp)を、それぞれ解析対象領域とした。

4. 研究成果

(1)供試した6検体のナガキクイムシについて、500bp強の塩基配列を決定した。

以前に取得していた“日本海型”および“太平洋型”の配列とアラインメントをとったところ、“日本海型”とは80bp以上の相違が認められた一方で、“太平洋型”との相違は3bp以下と高い相同性を示した。

以上から、本実験に供試したナガキクイムシは“太平洋型”と判断して間違いのないことが確認できた。

この解析により、“太平洋型”が“日本海型”のカシナガとは分子系統学的に極めて明確にかけ離れていることが改めて確認できた。ナラ枯れの拡大要因・メカニズムを議論する際には、“太平洋型”が“日本海型”とは別種である(すなわち、“太平洋型”はカシナガではない)可能性を踏まえる必要があると考えられる。

また、本研究で解析対象とした cytochrome oxidase 遺伝子の塩基配列による虫種の簡易鑑別法は、難解な形態観察に基づいたナガキクイムシの種同定の代替法として、今後検討する価値のある研究テーマと考えられる。

(2)希釈平板法によって“太平洋型”坑道壁から菌類を分離した。同時に、平板上に出現したコロニーを計数し、坑道株における菌類の存在量を推定した。6検体合計で、菌類のコロニーが2508出現した。目視によるコロニーの観察により一次グルーピングを行い、その代表株として168株を分離した。これらからDNAを抽出し、Microsatellite-primed PCR fingerprint 法

によって分離株の二次グルーピングを行った。この結果をもとにさらに 39 株を選定し、Large subunit (26S) ribosomal RNA 遺伝子 D1/D2 領域の塩基配列をサンガー法によって決定し、BLASTn 検索により分離菌株の種を推定した。以上の結果をまとめて図 1 に示す。

なお、本研究で得られた微生物株の一部は、微生物株のカルチャーコレクションである理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室に寄託した（菌株番号：JCM 19181-19183）。

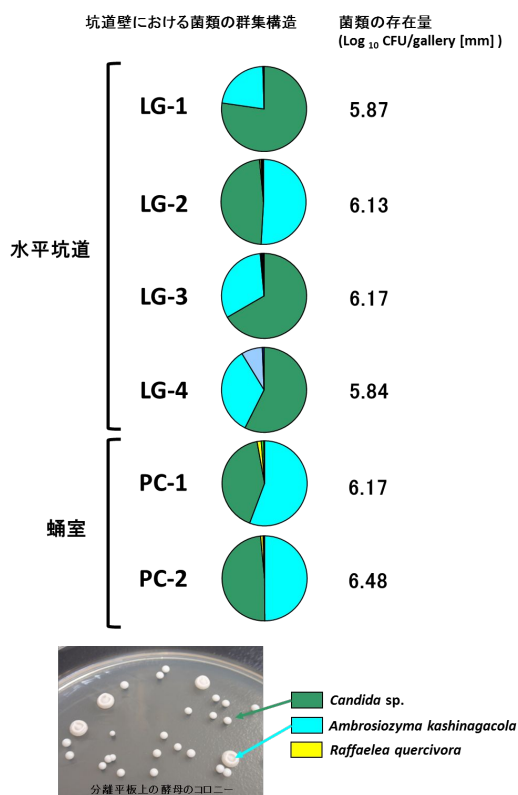


図 1 . 培養法によって解析した“太平洋型”坑道壁の菌類群集構造。円グラフそれぞれが 1 検体の群集構造を表す。

“太平洋型”の坑道壁で優占していた菌類は、2 種の子嚢菌系酵母 *Candida* sp. と *Ambrosiozyma kashinagacola* (旧名: *Candida kashinagacola*) であった。供試した 6 検体全てから分離されたのは上述の 2 種とナラ菌 *Raffaelea quercivora* のみであった。この結果は、Endoh et al. (2011) で報告した“日本海型”における坑道壁の菌類群集と酷似するものであった。坑道 1mm あたりの菌類の存在量は 100 万 CFU (colony forming unit) 前後であり、“日本海型”の坑道壁における菌類存在量と大きな違いは無かった。

(3) “日本海型”・“太平洋型”ともに坑道壁で優占していた未同定酵母 *Candida* sp. について、生理生化学性状試験を行った。供試菌株として *Candida* sp. JCM 15000-15004, 16724-16726 (以上、“日本海型”からの分離株) と *Candida* sp. JCM 19181, 19182 (以上、

“太平洋型”からの分離株) を用いた。その結果、両者の生理生化学性状に明確な差は見られず、かつ分子系統学的な分岐も乏しいことから、同種と考えられることが判った。

以上をまとめると、ナラ枯れのベクター側 (“日本海型”・“太平洋型”) には明確な分子系統学的分岐があったのに対し、主要共生酵母側には分岐がほとんど無いということになる。研究代表者の知る限り、このような共生関係は他に研究例が無い。昆虫と酵母で共通の「種」の概念を適用できないため、進化的な分岐の程度を共通の尺度で評価することが今後の重要な課題である。そのうえで、本研究で得られた結果を注意深く議論していく必要があるだろう。

(4) 培養法による菌類群集解析で供試したものと同一坑道壁を用いて、“太平洋型”巢壁の微生物群集構造の解析を行った。

上述の 6 検体を用い、真核微生物・原核微生物それぞれを対象に 1stPCR を行い、計 12 検体のアンプリコンを次世代シーケンサーのランに供試した。その結果、合計で約 7 万リードの素配列を得た。

真核微生物の群集解析の結果、培養法で解析した群集構造と概ね一致する結果を得た。すなわち、*Candida* sp. と *Ambrosiozyma kashinagacola* が優占している傾向が再現された。但し、培養法では検出できたナラ菌が、非培養法では検出できなかった。これは、ナラ菌では解析対象の領域 (D2 領域) に特異な G または C の連続配列が含まれているため、1stPCR でバイアスが働いて増幅されにくかったためと考えられる。

原核微生物の群集解析の結果、供試した 6 検体全てから *Actinomyces* sp. と見られる放線菌の配列が検出された。他にも、酢酸菌の一種や β -プロテオバクテリアと見られる菌種も高頻度に検出された。

ナガキクイムシの共生バクテリアについては報告が全く無く、世界的に新規性の高い知見が本研究により得られた。分子系統学的所屬から判断する限り、検出された *Actinomyces* sp. は嫌気性菌の可能性があり (難培養の可能性も考えられる) 分離菌株を確立するために培養法を今後検討する必要はある。

本研究は、ナガキクイムシ科養菌性キクイムシの共生ミクロビオームの全体像解明に向けた重要な第一歩と位置付けられる。

養菌性キクイムシは菌栽培昆虫 (Fungus-farming insects) の代表例であり、そのユニークな生態ゆえに注目度の高い一群であるといえる。カシナガを含むナガキクイムシの生態研究は、森林保護の観点に留まらず、我が国が森林科学・生態学・微生物学研究的国際的イニシアティブを執るうえでも重要なテーマであり、研究の一層の発展が強く望まれるものであろう。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

Tanimura A, Takashima M, Sugita T, Endoh R, Kikukawa M, Yamaguchi S, Sakuradani E, Ogawa J, Ohkuma M, Shima J. *Cryptococcus terricola* is a promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. *Scientific Reports* (2014) 4:4776、査読有、doi:10.1093/gbe/evu067

Tsai IJ, Tanaka E, Masuya H, Tanaka R, Hirooka Y, Endoh R, Sahashi N, Kikuchi T. Comparative genomics of *Taphrina* fungi causing varying degrees of tumorous deformity in plants. *Genome Biology and Evolution* (2014) 6(4):861-872、査読有、doi: 10.1038/srep04776

Tanimura A, Takashima M, Sugita T, Endoh R, Kikukawa M, Yamaguchi S, Sakuradani E, Ogawa J, Shima J. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. *Bioresource Technology* (2014) 153:230-235、査読有、doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.086

Takashima M, Sugita T, Van BH, Nakamura M, Endoh R, Ohkuma M. Taxonomic richness of yeasts in Japan within subtropical and cool temperature areas. *PLoS One* (2012) 11: e50784、査読有、doi: 10.1371/journal.pone.0050784

遠藤 力也、森林甲虫と酵母、日本森林学会誌、Vol.94、2012、No.6、pp326-334、査読有、doi: 10.4005/jjfs.94.326

[学会発表](計 6件)

遠藤 力也、升屋 勇人、大熊 盛也、和歌山県産ナガキクイムシ *Platypus* sp. の坑道の菌類群集、日本森林学会第 125 回大会、2014 年 3 月 29 日、大宮ソニックシティ(大宮)

Endoh R, Ohkuma M. Yeasts associated with Coleopteran beetles in Japan. The 13th International Conference of Culture Collections (ICCC 13)、2013 年 9 月 25-26 日、北京(中華人民共和国)

遠藤 力也、升屋 勇人、大熊 盛也、森に酵母資源の宝庫を見つける、日本微生物資源学会第 20 回大会、2013 年 6 月 27 日、つくば国際会議場(つくば)

遠藤 力也、升屋 勇人、大熊 盛也、和

歌山県産ナガキクイムシ *Platypus* sp. の坑道の菌類群集、日本菌学会第 57 回大会、2013 年 6 月 8 日、東京農業大学(東京)

遠藤 力也、森の虫に有用酵母の故郷を見つける、第 5 回新産業酵母研究会講演会、2013 年 5 月 24 日、東京大学(東京)

遠藤 力也、酵母生態学に挑む、筑波大学ブレ戦略イニシアティブ「生物機能の高度利用を目指した応用微生物学研究拠点」シンポジウム つくばの応用微生物研究～理研 BRC-JCM、産総研、2012 年 12 月 20 日、筑波大学(つくば)

[図書](計 1件)

遠藤 力也、高島 昌子、(株)エヌ・ティー・エス、実践 有用微生物培養のイロハ(片倉啓雄 編) 第 5 章 継代と保存、2014、印刷中

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

日本微生物資源学会第 20 回大会([学会発表])において優秀発表賞受賞

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠藤 力也 (ENDO Rikiya)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・協力研究員
研究者番号: 90634494

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し